

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-153981

(43)公開日 平成5年(1993)6月22日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/54	Z N A			
A 0 1 H 5/00		A 8502-2B		
5/10		8502-2B		
		8828-4B	C 1 2 N 15/ 00	A
		7236-4B	5/ 00	C

審査請求 未請求 請求項の数3(全 17 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平3-316935	(71)出願人	000005979 三菱商事株式会社 東京都千代田区丸の内2丁目6番3号
(22)出願日	平成3年(1991)11月29日	(71)出願人	000005968 三菱化成株式会社 東京都千代田区丸の内2丁目5番2号
		(72)発明者	中島 みどり 神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 株 式会社植物工学研究所内
		(72)発明者	寺田 理枝 神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 株 式会社植物工学研究所内
		(74)代理人	弁理士 長谷川 一 (外1名) 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 アミロース含量の改変されたイネ科植物およびその製造法

(57)【要約】

【構成】 胚乳で発現するプロモーターの下流にイネでんぷん合成酵素遺伝子のセンスDNAまたはアンチセンスDNAを導入してなるベクターをイネ科植物由来のプロトプラストに導入し、アミロース含量の改変された形質転換イネを作出する。

【効果】 本発明によれば、イネのアミロース含量を改変することができるので、コメの食味を意図的に改良したイネを得ることができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 胚乳で発現するプロモーターの下流にイネでんぷん合成酵素遺伝子のセンスDNAまたはアンチセンスDNAを導入してなるベクター。

【請求項2】 請求項2に記載のベクターをイネ科植物由来のプロトプラストに導入し、コロニーを形成させた後該コロニーから植物体を再生させて得られたイネ科植物。

【請求項3】 請求項2に記載のベクターおよびイネ科植物由来のプロトプラストを液体媒体に懸濁し、電気パルスを加して該ベクターを該プラスミドに導入した後、イネ培養細胞を含有する培地で培養してコロニーを形成させ、該コロニーから植物体を再生させることを特徴とするイネ科植物の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、アミロース含量の改変されたイネ科植物およびその製造法に関し、詳細にはイネでんぷん合成酵素遺伝子のセンスDNAまたはアンチセンスDNAを導入することによりコメの食味を意図的に改良したイネ科植物およびその製造法に関する。

【0002】

【従来の技術および発明が解決しようとする課題】 イネは世界の半数以上の人々のために重要な食料であるばかりでなく、コメの栄養価の高いことや、調理の方法が豊富で美味しいことから、その需要はますます高まりつつある。従来、イネの育種は変異の収集（野生種）、栽培種からの無作為的な変異の誘発、あるいはそれらの交配により行われてきた。これは方向性のない雑多な変異の中から目的の形質を持つものを選び出し、純系を作り上げるという、実に多大な労力と時間を要するプロセスである。例えば、ガンマ線照射により栽培種由来の変異体の中から目的の変異体を得ることはできるが、変異処理によってその他の遺伝子も変異を受けている場合が多いので、直ちに栽培品種とするには障害が多い。

【0003】 これに対して遺伝子操作を用いた組換えイネの作出は、目的の形質を司る遺伝子のみを対象にして人工的に改変し導入するので、極めて方向性の高い育種方法を提供することができる。これは、①形質を司る遺伝子を単離し、②この遺伝子を目的の組織や部位で発現し得るように改変し、③かかる遺伝子を植物体に導入し、再生させることによって初めて達成されるものである。

【0004】 ところで、おいしいコメを育種するために従来はかけあわせによる方法が行われてきた。この方法の問題点は、選抜途上で指標となる“おいしさ”の尺度がないことであった。即ち、従来法では官能検査によって味が判定されるまで、目標が達せられているかどうか判らなかつた。こういった問題から、良食味のイネの成分分析から、生化学的な値を用いて“おいしさ”を評

価しようとする試みが検討されだしてきた。これは、コメの成分を改変することで、“良食味”を達成しようという考えである。即ち、形質を司る遺伝子そのものを改変し成分の改変を行うことにより確率の高い意図した育種が可能になる。この方向性の高い育種（遺伝子操作法）をおこなうためには現在以下の事が明らかである。

【0005】 まず上記①として、コメの食味試験と生化学的解析からアミロース含量と食味に相関があることが知られている。日本人の米飯に供されるうるち米は、でんぷんの15-30%程度がアミロース、70-85%程度がアミロペクチンであるが、一般にアミロース含量の低い、従って、粘りのある物が良食味の傾向にある。また、アミロースを全くもたないものは、もち米としてうるち米と区別して食している。

【0006】 さて、胚乳のアミロース産生を司るのはでんぷん合成酵素であるということがトウモロコシの遺伝生化学的解析（Parnell, J. Genet., 11, 209-212, 1921）から明らかにされ、またイネ胚乳のアミロース含量は登熟期におけるでんぷん合成酵素蛋白の生産量および活性に依存すること（Villareal, Starch/Starke, 41, 369-371, 1989）がわかってきた。でんぷん合成酵素（Wx蛋白）の遺伝子（Wx遺伝子）はトウモロコシ（Klosgen, Mol. Gen. Gen., 203, 237-244, 1986）、大麦（Rhode, Nucl. Acid Res., 16, 7185, 1988）、イネ（Wang, Nucl. Acid Res., 18, 5898, 1990、Okagaki, Genetics, 120, 1137-1143, 1988）ジャガイモ（Visser, Plant Sci., 64, 185-192, 1989）で単離されている。

【0007】 ②はセンスのWx遺伝子を導入してWx蛋白を産生させたり、アンチセンスのWx遺伝子を導入してその蛋白の産生を抑えたりして植物の形質を優性に改変させるためのDNA部品の選択と構築である。ジャガイモのWx遺伝子のアンチセンスDNAをカリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモーターを用いてジャガイモに導入発現した実験例（Visser, Mol. Gen. Gen., 225, 289-296, 1991）が報告されているが、その組織特異性、時期特異性については考慮されていない。

【0008】 ③は遺伝子導入の手段であるが、イネにおいてはプロトプラストにエレクトロポレーションでDNAを導入しナース培養を施して植物を再生させる方法（Shimamoto, Nature, 338, 274-276, 1989）が極めて再現性がよいとされる。このようにWx遺伝子をイネに導入するために最低限必要な条件は散在しているが、これらを集約した形質転換イネの作出には至っていない。

[0009]

【課題を解決するための手段】本発明者らは、イネ科植物のアミロース含量を改変する目的で検討を重ねた結果、Wx遺伝子のセンスDNAあるいはアンチセンスDNAを植物体に導入することにより、所望のアミロース含量を有するイネを作出することができることを初めて見出し、本発明を完成するに至った。

【0010】即ち本発明の要旨は、胚乳で発現するプロモーターの下流にイネでんぷん合成酵素遺伝子のセンスDNAまたはアンチセンスDNAを導入してなるベクター、該ベクターを導入して形質転換されたイネ科植物およびその製造法に存する。以下、本発明につき詳細に説明する。本発明において導入するのは、イネでんぷん合成酵素(Wx)遺伝子(Okagaki, *Genetics*, 120, 1137-1143, 1988)のセンスあるいはアンチセンスDNAである。このDNAはcDNAでもゲノミックDNAでも、また全長でも一部でも良い。

【0011】例えばWxのアンチセンスDNAを導入する場合、発現したアンチセンスRNAがイネ胚乳でWx mRNAとハイブリッドを作ると仮定すれば、それらの塩基配列の相同性が高いほど効率が良い。従って導入するアンチセンスDNAはイネ(*Oryza*)自身のWx遺伝子を用いることが好ましい。トウモロコシ(Klosgen, *Mol. Gen. Gen.*, 203, 237-244, 1986)、大麦(*Rhizide, Nucleic Acid Res.*, 16, 7185, 1988)でWx遺伝子が単離されており、これらはイネのものとホモロジーがあるが、N末付近(トランジットペプチド)の配列は相同性が低い。一方*Oryza sativa*と*Oryza glaberrima*の間では配列がほとんど一致している(Umeda, *Jpn. J. Genet.*, 66, 569-586, 1991)。

【0012】また、アンチセンスRNAは内在する本来の遺伝子の転写もしくは翻訳を阻害すると考えられているので、内在するWx mRNAの1次転写物とハイブリダイズするアンチセンスRNAの鋳型となるゲノミックDNA断片を導入すること、あるいは2次転写物とハイブリダイズするアンチセンスRNAの鋳型となるcDNAを導入することが好ましい。そこで本発明においては特にゲノミックDNAとしてはWx遺伝子の翻訳開始周辺を含みさらに数個のイントロンをも含むPst1断片2.3kb(配列表の配列番号1:配列中5'末端から数えて148番め以降は前述のWangの文献に開示されている)参照)を用い、cDNAは2次転写物のほぼ全域にわたると考えられる2.7kb断片を用いることが好ましいと考えられた。

【0013】WxのセンスDNAを導入する場合は、Wx遺伝子の翻訳領域のN末にはトランジットペプチドがありアミロプラストへのターゲティングシグナルと

なっている(Klosgen, *Mol. Gen. Gen.*, 217, 155-161, 1989; *ibid.*, 225, 297-304)。従って、導入した遺伝子からWx蛋白を作らせアミロプラストに蓄積させるためにはインタクトなWx蛋白が翻訳されるように全翻訳域を用いる必要がある。従って本発明においては、Wx蛋白のオープンリーディングフレーム全域を含む2.7kb Wx cDNAを用いるのが好ましい。この断片には翻訳開始前に0.45kbのリーダー配列が存在する。この配列の機能は明らかでないが翻訳開始周辺の塩基配列について検討した例があるので(Kozak, *Microbiol. Reviews*, 47, 1-45, 1983) Wx遺伝子由来の配列をインタクトな状態で用いるのが好ましいと考えられた。

【0014】次に上記の遺伝子を導入した発現ベクターを構築する。胚乳でかかる遺伝子を十分量発現させるためには、ベクター構築の際に特異的なプロモーターを用いることが重要となる。現在、イネ胚乳での発現が確認されているプロモーターとして、イネWxプロモーター(Hirano, *Plant Cell Physiology*, *accepted*)、トウモロコシAdh1プロモーター(Kyozuka, *Mol. Gen. Gen.*, 228, 40-48, 1991)、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター(Terada, *Mol. Gen. Gen.*, 220, 389-392, 1990)があげられる。またその発現の強さはWx>Adh>35Sと推定されるので、プロモーターの種類を変えることでアンチセンスRNA(またはセンスRNA)の生産量を調節することができると考えられる。従って本発明のベクターの構築に当たっては、発現強度の異なるプロモーターを数種用いるのが好ましい。

【0015】また、遺伝子の発現効率を上げるためあるいはRNAの安定性を上げるためにイネで機能するイントロンを連結させることも効果的である。イントロンの発現に及ぼす影響については例えば、トウモロコシAdh1のイントロン1がトウモロコシで有効(Callis, *Genes & Development*, 1, 1183-1200, 1987)であるだけでなく、イネでも効果的であること(Kyozuka, Maydica, 35, 353-357, 1990)や、ヒマカターゼのイントロンがイネで有効に働くこと(Tanaka, *Nucleic Acid Res.*, 18, 6767-6770, 1990)などの報告がある。

【0016】更に効率よく遺伝子の転写を終結させまたRNAを安定させるために、ターミネーターが用いられる。具体的には、ノバリン合成酵素遺伝子NOSのターミネーター(pBI221, Jefferson, EMBO J., 6, 3901-3907, 1987)あるいはカリフラワーモザイクウイルス35S(19S)RNAターミネーター(pGL2, Shimamoto,

Nature, 338, 274-276, 1989) 等
が挙げられる。

【0017】組み換え操作においては、pUC系列(Yanisch-Perron, Gene, 33, 103-119, 1985)のプラスミド等が好適に用いられる。本発明においては更に、ハイグロマイシンフォスフトランスフェラーゼ遺伝子、ネオマイシンフォスフトランスフェラーゼ遺伝子、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子、 β -グルキュロニダーゼ遺伝子等から選ばれる2つ以上の外来遺伝子を使用し、かつその1つは目的とするコロニーを選択する際に有効な、いわゆる選択マーカー遺伝子とするのが好ましい。かかる選択マーカー遺伝子としては、ハイグロマイシンフォスフトランスフェラーゼ遺伝子が好ましい。

【0018】本発明においては、選択マーカー遺伝子と他の外来遺伝子を同一のプラスミド中に有するものを使用してもよいし、選択マーカー遺伝子を有するプラスミドと他の外来遺伝子を有するプラスミドとを併用してもよい。上述のプラスミド、センスDNA発現用ベクターをWx遺伝子の劣性変異であるもち米(例えば、むさしもち、祝)に導入することにより、アミロースの合成を復帰させることができ、またうるち米に導入すればさらに高アミロースの米の育成が可能である。

【0019】アンチセンスDNA発現用ベクターをWx遺伝子の発現しているうるち米に導入することによりアミロースの産生量の低下した種子を得ることができる。かかるプラスミドをイネプロトプラストに導入、再生することによって、アミロース含量の変化したイネを作出する。イネ科植物由来のプロトプラストは次の様にして調製することができる。即ち、粳米として日本晴、あるいは糯米として祝稲、むさしもち等の栽培イネの完熟種子に由来するカルスを通常使用され得る液体培地で培養した後、常法に従い、例えばセルラーゼやマセロザイム等の細胞壁分解酵素を含む酵素液中25~30℃、3~16時間程度酵素処理する。酵素処理終了後ろ過して未消化物を除き、ろ液に2~5倍量のKMC液(塩化カリウム0.118M、塩化マグネシウム0.0817M、塩化カルシウム0.085M、pH6.0)(Theor. Appl. Genet., 53, 57-63, 1978)等を加え遠心分離し、精製されたプロトプラストを得ることができる。

【0020】本発明においては、粳米(日本晴)由来プロトプラスト、例えば $(2\sim10)\times10^6$ 個/mlに対しては、上記の様に調製したアンチセンスWxcDNA発現ベクター、あるいはアンチセンスWxゲノミックDNA発現ベクター、例えば1~100 μ g/ml、糯米(祝稲・むさしもち等)由来プロトプラスト、例えば $(2\sim10)\times10^6$ 個/mlに対しては、センスWxcDNA発現ベクター(例えば後述のpWsenseCW)、例えば1~100 μ g/ml、さらに、

各々の組合せに対し、選抜遺伝子としてハイグロマイシンホストランスフェラーゼをコードするベクター(pGL2:Shimamoto et al, Nature, 338, 274-276, 1989)、例えば1~100 μ g/mlを30~200mM塩化カリウム、0~50mM塩化マグネシウム、0.2~0.6Mマニトールを含む緩衝液等の液体媒体中に懸濁し、これに電気パルスを加えてプラスミドをプロトプラスト中に導入する。電気パルス処理は、100~1000 μ Fのコンデンサーを用いて得られる200~1000V/cmの初期電圧の直流パルスで、パルス幅1~30msec程度の条件で印加するのが好適である(特開平1-181791号公報参照)。

【0021】上述のようにして電気パルス処理したプロトプラストを、例えばR₂培地(Plant Cell Physiol., 14, 1113, 1973)の無機成分とB5培地(Gamborg et al., 50, 151, 1968)のビタミン混合液を含む液体培地(R₂/B5)好ましくは窒素源として硝酸カリウムを0.2~0.5%含有する培地に懸濁し、これを1.0~3.0%程度のアガロースを含むR₂/B5培地と等量ずつ混ぜ、速やかにシャーレ中に広げてうすく固める。この時のプロトプラストの密度は約 $(5\sim50)\times10^5$ 個/mlとなるようにし、またアガロースの厚さは平均0.7mm程度となるようにするのがよい。

【0022】固化したアガロースゲルを5~20mm程度の大きさに切り、上記液体培地中で培養する。その際、イネ科植物由来のプロトプラストを使用した場合には、好ましくは培地中にイネ培養細胞を100~300mgFW/シャーレ程度共存させ、20~50r.p.m.の回転でゆっくり振とうしながら、暗条件下27~33℃で培養する。

【0023】培養後3~4週間で、0.5~1mm ϕ 程度のコロニーが形成される。その際、例えば選択標識遺伝子であるハイグロマイシンホストランスフェラーゼ遺伝子を導入しておいた場合、培養開始後7~20日にハイグロマイシンを10~50 μ g/ml程度培養液中に添加し、更に培養を続けることで形質転換細胞の一次選択を効率よく行うことができる。

【0024】次いでこのコロニーを増殖培地、例えばR2基本培地(Sci. Sin., 16, 659-688, 1975)に植物ホルモン、例えば2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(2,4-D)を2mg/リットル程度、アガロースを0.1~1.0%加えた寒天培地上で2~4週間、照明下(1000~4000lux)、27~33℃で培養し、3~6mm ϕ のカルスを得る。このカルスの一部からゲノムDNAを、例えば,Mol. Gen. Genet., 211, 27-34, 1988に準じて単離し、このゲノムDNA約100ngを、次のPCR法に供することで、アンチセンスWxcDN

AおよびアンチセンスWxゲノミックDNA、あるいはセンスWx cDNAのとり込まれた形質転換カルスを二次選択することができる。

【0025】PCR法(Saiki, Science, 239, 487-491, 1988)は、鋳型の熱変性、プライマーと鋳型とのアニーリング及び耐熱性ポリメラーゼによる伸長方法からなる工程を繰り返すことにより、標的DNA領域を増幅する方法である。本発明においては、上記で得られたゲノムDNAを94℃、1分程度で熱変成して+鎖と-鎖の1本鎖に解離し、導入されたアンチセンスWx DNA、あるいはセンスWx cDNAの+鎖及び-鎖の5'末端に相補的なプライマーをアニーリングした後、耐熱性ポリメラーゼにより相補鎖DNAを合成(72℃、3分程度)するという工程を20~30回繰り返して該相補鎖DNAを増幅する。

【0026】アンチセンスWx cDNA、およびアンチセンスWxゲノミックDNA、あるいはセンスWx cDNAの導入が確認されたカルスを再生培地、例えばR2基本培地(Sci. Sin, 16, 659-688, 1975)に植物ホルモン、例えばインドール酢酸(IAA)を0.5mg/リットル程度、ゼアチン1mg/リットル程度、アガロース0.6~1.5%加えた寒天培地上で2~8週間、照明下(1000~4000 lux)、27~33℃で培養し再生幼植物を得る。次いで幼植物を順化後、温室にて育成することで3~6ヶ月後に種子を形成する。

【0027】導入遺伝子の存在は、ゲノミックDNAのサザン解析(Southern, J. Mol. Biol., 98, 503~517, 1975)によって確認できる。例えばゲノムDNAは(Walbot et al, Mol. Gen. Genet., 211, 27-34, 1988)に準じて調整し、その2μgを50μlの反応系(組成はTOYOBO Co.による)においてEcoRIで切断する。これを1回エタノール沈殿し70エタノールで洗って乾燥し水10μlにとかし泳動用色素(Molecular Cloning)2μlを加えて1%アガロースゲル電気泳動(FMC SEAKEM GTGAGAROSE, TBE緩衝液)で分画する。これをアマシヤム社ハイボンドNメンブレン取扱説明書の方法に準じて酸部分分解、アルカリ変成してハイボンドN膜にプロットする。膜は42℃で1時間以上プレハイブリダイゼーションする(50%ホルムアミド×4 SSCP(Molecular Cloning)1% SDS, 0.5%スキムミルク, 0.25mg/ml ウシ精子DNA)。

【0028】プローブはWx遺伝子のcDNA 2.7kb断片25ngをアマシヤム社マルチプライムラベリングキットと[α-³²P] dCTPにより調整する。熱変性したプローブをハイブリダイゼーション液(0.1g, デキストラン硫酸/ml プレハイブリ液)に混合

し、プレハイブリダイゼーション液をきった膜にまぶし42℃で1晩静置する。2×SSC+0.1% SDS 100ml中で15分×2回室温で振とうし、さらに0.1×SSC+0.1% SDS 100ml中で15分×2回洗ってプローブの特異的な結合をオートラジオグラフィで検出する。Wx遺伝子のcDNAを導入した場合2.7kbのバンドとして検出され、予めゲノムに存在するWx遺伝子6kbと区別できる。

【0029】種子あるいは花粉におけるアンチセンスWx cDNAおよびアンチセンスWxゲノミックDNAあるいはセンスWx cDNAの発現は公知の“ヨードによるアミロース検定法”により行なわれる。アミロースおよびアミロペクチンは、製造上の違いから、ヨウ素(Ⅰ)分子との結合力に差があるため、花粉あるいは種子を、例えば7.1mMのヨウ素、3.4mMのヨウ化カリを含む、ヨード液中におくことで、粳米やその花粉は濃紫色から黒褐色、糯米やその花粉は淡紫色から白色を呈する。かかる呈色反応を指標としてアミロース含量の変化を推定し、アンチセンスWx cDNA、アンチセンスWxゲノミックDNA、あるいはセンスWx cDNAの発現の確認、および発現の程度を判定することができる。

【0030】

【実施例】以下に実施例を挙げて本発明を説明するが、本発明はその要旨を越えない限り本例に制約されるものではない。

(実施例1)

アンチセンスWxゲノミックスDNAのうるち米への導入

I. ベクターの構築(pAantiGW) (図1参照)
イネWx遺伝子全域を含むHindIII断片15kb(Okagaki, Genetics, 120, 1137-1143, 1988の図4)をpUCプラスミドにクローニングし、その10μgをPstI 20μlで切断し(TOYOBOの添付したバッファーを用い20μlスケールで37℃1時間反応)1%seakemGTGアガロース(FMC)ゲル電気泳動(1×TBEバッファー, Molecular Cloning, Maniatis)で分画(MUPID, コスモバイオ, 100V, 30分)し、ゲルを0.5μg/l 臭化エチデウムで染色して翻訳開始点を含む2.3kbの断片を切り出し、透析膜(三光純薬)に移して4℃120mA 1時間の電気泳動によりDNAを回収した。等容量のフェノール(10mM Tris pH8-1mM EDTA pH8で飽和したもの)で振とうし、層を分離して水層を回収する。さらにクロロホルムなどでこのDNA断片を精製しエタノール沈殿(30mM 酢酸ナトリウム存在下に2.5容のエタノールを加え、15000rpm 15分冷却遠心分離し沈殿を回収する)後、5μlの水にとかしその1μlを、PstIで切断

したプラスミド pBluscript II KS+ (Stratagene) 0.1 μ g とを TAKARA ライゲーションキット (TAKARA の処方による 70 μ l) を用いて連結した (16 $^{\circ}$ C, 一晚)。

【0031】この 5 μ l をコンピテントセル DH5 α (BRL) に形質転換し (Inoue, Gene, 96, 23-29, 1990) アンピシリン 50 μ g/ml を含むマッコンキー寒天培地 (DIFCO) 上でインサートを持つ白いコロニーを選抜した。これらのコロニーに由来する 1ml 培養液 (Lプロス、Molecular Cloning) から DNA をアルカリ SDS 法 (Molecular Cloning) で調製しその 1/50 量を EcoRI 1u (TOYOBO) で切断して (10 μ l 反応系 RNase 0.5 μ g/ml を含む 37 $^{\circ}$ C 30分)、0.75 kb のバンドを生じるクローンを選んだ。EcoRI 部位は挿入した断片の 5' 寄り 0.75 kb にある。

【0032】このプラスミドには Wx 遺伝子の下流にベクターに由来する BamHI 部位があるが、ここにトウモロコシ Adh1 遺伝子 (Callis, Genes & Development, 1, 1183-1200, 1987) のプロモーター 1.1 kb (BamHI-Bgl II) とイントロン 522 bp (Bcl II - BamHI) とを挿入した。トランスフォーマントは、Hind III で切断するとイントロンとマルチクローニングサイトに挟まれる 2.4 kb が検出されるものを選ぶ。このプラスミドは Adh1 プロモーター、イントロンの後ろに Wx 遺伝子が逆向きに連結されている。

【0033】ターミネーターシグナルはカリフラワーモザイクウイルス 35S RNA 遺伝子由来のものを用いた。プラスミド pCKR138 (Shimamoto, Nature, 338, 274-276, 1989) 10 μ g を SacI と KpnI で切断し (TOYOBO 処方のバッファー条件で 5u ずつ 20 μ l 反応系 37 $^{\circ}$ C 1時間) 電気泳動で 0.26 kb のターミネーター断片を得て、これを上記のアンチセンスゲノミック DNA を含むプラスミドの SacI, KpnI 部位に挿入してプラスミド pAantiGW を得た。このプラスミドは 5' から順にトウモロコシ Adh1 プロモーター (1.1 kb)、イントロン (522 bp)、アンチセンスイネ Wx ゲノミック DNA (2.3 kb) カリフラワーモザイクウイルス 35S ターミネーター (0.26 kb) を有する。

【0034】II. 形質転換とアンチセンス Wx ゲノミック DNA の導入されたカルスの選択、再生
粳米 (日本晴) の完熟種子由来カルスより作製したサスペンションは 7 日ごとに 20 ml の R₂ 培地で植え継ぎ維持したものを用いた。サスペンション 1 本分に由来する細胞 (湿重 FW 約 5g) を 20 ml の酵素液 (4% セルラーゼ RS, 1% マセロザイム R10, 0.4M マン

ニトール, pH 5.6) で 4~6 時間、30 $^{\circ}$ C で処理し、20 μ m のメッシュで濾過した液を 1.5 容の KMC 液 (118mM 塩化カリウム, 81mM 塩化マグネシウム, 85mM 塩化カルシウム, pH 6.0) で希釈し、遠心分離してプロトプラストを得た。これを KMC 液で 2 回洗浄し、EP3 液 (70mM 塩化カリウム, 5mM 塩化マグネシウム, 0.4M マンニトール, 0.1% MES, pH 5.8) でさらに 1 回洗って細胞密度 8 $\times 10^4$ 個/ml となるように EP3 液に懸濁した。

【0035】粳米 (日本晴) プロトプラスト懸濁液 500 μ l (4×10^6 個) に対しては、上述のアンチセンスゲノミック DNA 発現ベクター (pAantiGW) 15 μ g (30 μ g/ml) とハイグロマイシンフォスフォトランスフェラーゼ (hph) 遺伝子 (pGL2) 15 μ g (30 μ g/ml) を加え電気パルスを加した (PROMEGA X-Cell™ Electroporation System, 1000 μ F コンデンサ, 初期電圧 500V/cm, パルス幅 25 msec, 直流減衰波形)。パルス印加前に 20 分、印加後に 20 分サンプルを氷中にて冷却し、等量の R₂/B5 プロトプラストアガロース培地 (Mol. Gen. Genet., 206, 408, 1987) と混合し、35mm ϕ のシャーレで固化させた。これを 4 分割し 60mm ϕ のシャーレに入れ、R₂/B5 プロトプラスト液体培地 5ml と OC サスペンション細胞 (ナース細胞) 約 100mg とを加えて 30 $^{\circ}$ C 暗下で振とう培養した (50 rpm)。10~14 日後、20 細胞程度に分裂したときにナース細胞を KMC 液で洗浄除去し新たな R₂/B5 プロトプラスト液体培地 5ml を加え、さらにハイグロマイシン B (Hm) 30~100 μ g/ml を加えて選抜を開始した。これから 3 週間後、アガロースビーズを Hm 40 μ g/ml を含む R₂ 増殖培地 (Mol. Gen. Genet., 206, 408, 1987) に移し、2 週間培養するとアガロース表面に耐性カルスが出現した。このカルスを個別にとり再び R₂ 増殖培地 (Hm 40 μ g/ml) で選抜を行い増殖のよい黄色カルスを「耐性カルス」として選んだ。

【0036】ハイグロマイシン耐性カルスの一部からゲノム DNA を調製し、アンチセンス Wx ゲノミック DNA の一部をプライマーとした PCR を行うことでアンチセンス Wx DNA の導入されたカルスをさらに選抜した。ゲノム DNA は Mol. Gen. Genet., 211, 27-34, 1988 に準じて次の様に調整する。

【0037】ハイグロマイシン耐性カルス 50~100mg を緩衝液 (15% ショ糖, 50mM トリス-塩酸 (pH 8.0), 50mM NaEDTA, 500mM 塩化ナトリウム) 中で摩砕し、核分画を遠心分離する。これを界面活性剤 (1.5% SDS, 20mM トリス-塩酸 (pH 8.0), 10mM EDTA) で処理し、

遊離した核内成分を0.6容のイソプロパノールで沈殿させて核酸を得、これを70%エタノールで洗浄後乾燥させてゲノム分画とする。この分画100ngをPCR法に供した。この時、プライマーはpAantiGWの+鎖のadh1のプロモーター領域、18塩基（プライマー（A）；68-85；Dennis et al, N

ucl. Acids Res., 13, 727-743, 1985 5' ACCGCTTAGGCGATTGTC3'）と、一鎖の第3イントロン、第3エクソン部分、18塩基（プライマー（B）；配列番号：1の1713番-1730番；【化1】

第3イントロン ← 第3エクソン

を用いた。PCR法はPerkin Elmer Cetus社のDNA Thermal Cycler機を用い、同社のGene-Amp kitのプロトコルにより試薬を混和し、反応液100μlを、熱変性94℃、1分、アニーリング61℃、2分、耐熱性ポリメラーゼによる伸長反応72℃、3分のサイクルを30回くりかえすことで行った。反応後1/10量をアガロースゲル電気泳動で分析し増幅したバンドを検出した。アンチセンスWxゲノミックDNAの導入が確認されたカルスを、R2再生培地（Mol, Gen, Gene t., 206, 408, 1987）におき、2週間毎に培地を交換しながら培養することで、4~8週間後に不定胚経路の再生植物を得た。この幼植物を、パーミキュライトと培土を混合したものに移植し、順化したのち、温室で育成した。3~6ヶ月後に成熟したイネとなり種子を形成した。

【0038】III. 花粉および完熟種子におけるアンチセンスWxゲノミックDNAの発現の確認

花粉、あるいは完熟種子胚乳部分の切片（1mm幅）を、ヨード液中におき浸透させた。5分後、稈型イネ（アミロース含量15~25%）の花粉では黒褐色、糯型イネ（アミロベクチン100%）の花粉では茶褐色を呈し、アンチセンスWx遺伝子の導入されたイネの花粉は、稈型、糯型、両者の中間型が混在することが観察された。完熟種子胚乳切片においても、稈米では黒紫色、糯米では白色を呈するのに対し、アンチセンスWx遺伝子の導入された種子では、稈米以外に中間型を呈するものが観察された。

【0039】（実施例2）

アンチセンスWx cDNAのうるち米への導入ベクター（pAantiCW）の構築（図2参照）このプラスミドは実施例1のベクターと2つの点で異なっている。アンチセンスDNAとしてcDNAを用いたことと、ターミネーターとしてNOS遺伝子由来のシグナルを用いたことである。以下その構築について述べる。

【0040】プロモーター、イントロンは実施例1と同じものにしてpALIGN（Kyo zuka, May d i ca, 35, 353-357, 1990）を改変して用いた。まず、pALIGNのNOSターミネーターの後ろにあるEcoRI部位を消去するために、このプラスミド1μgをEcoRIで切断（TOYOBO処方）、エ

タノールで精製しKlenowフラグメント（TOYOBO 10u）で末端を修復した（TOYOBOの条件20μl 37℃ 30分）後、0.1μgを自己環化（TAKARA ライゲーションキット40μl 16℃ 一晚）してトランスフォーマントを得た。

【0041】EcoRIで消化されないクローン（pALIGNe）を選び、その1μgをSacI（TOYOBO）で切断（TOYOBO処方20μl 反応系30℃ 30分）、エタノールで精製してT4DNAポリメラーゼ（TOYOBOの条件10u室温5分）で末端を揃え、エタノール沈殿の後SmaI（TOYOBO）で切断しエタノール沈殿してその0.1μgにEcoRIリンカー（TOYOBO 1μg）を連結した（TAKARAライゲーションキット16℃ 40μl一晚）。トランスフォーマントの中から、クローン（pALIGNe）より1.8kb（GUS遺伝子相当分）短く、かつEcoRIで1か所切断されるクローン（pAlecoN）を選ぶ。

【0042】一方、Wx遺伝子のcDNAは以下のようにして調製した。イネアメリカ長粒種ラベルの開花後6~8日のミルクリーな胚乳10gからフェノールSDS法（Current Protocols in Molecular Biology）により全RNAをとり、ファルマシAmRNAビューリフィケーションキットを用いてmRNAを精製した。その5μgを鋳型にしてファルマシcDNA合成キットを用いてcDNAを得てこれをpUC19のEcoRI部位に挿入してつくったcDNAライブラリに対して、トウモロコシのWx遺伝子プローブ（Okagaki, Genetics, 120, 1137-1143, 1988の図3-#2）を用いてスクリーニングを行い（Molecular Cloning）、2.7kbのWx cDNAを得た。このクローンはWx遺伝子の全翻訳域を持ち0.45kbのリーダー配列をもつ。このWx cDNA断片をEcoRIを用いてpUCベクターより切り出し、上述のクローンpAlecoNのEcoRI部位にプロモーターと逆向きに挿入してpAantiCWを得た。

【0043】形質転換とアンチセンスWx cDNAの導入されたカルスの選抜、再生

実施例1のpAantiGWのかわりにここではpAantiCWを用い、以下同様にしてカルスを得た。遺伝子の組込まれたカルスの検出のためにPCRを行うが、

このプライマーとしてWx cDNAの+鎖の第2、第3エクソンにまたがる18塩基(プライマー(C);配列番号:1の1595番-1603番及び1717番-1725番;5' GCCATGGCT/GCGAATGGC 3')と、-鎖の第4、第5エクソンにまたがる18塩基(プライマー(D);配列番号:1の2108番-2100番及び2003番-1996番;5' TCCCCAAAC/CTTCTCCA 3')を用いた。また、再生体の葉より(Walbot, Mol. Gen. Gen., 211, 27-34, 1988)の方法に準じて抽出したゲノミックDNAをEcoRI切断しWx遺伝子のcDNAをプローブにしてサザン解析を行い、導入した2.7kbのバンドを検出した。以下、実施例1と同様に処理し、成熟イネの再生を行った。

<花粉および完熟種子におけるアンチセンスWx cDNAの発現の確認>実施例1と同様に行い、同様の結果を得た。

【0044】(実施例3)

アンチセンスWx cDNAのうるち米への導入ベクター(p35 antiCW)の構築(図3参照) このプラスミドは、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーターの下流にアンチセンスWx cDNAおよびNOSターミネーターを持つ。35SプロモーターとNOSターミネーターはpB1221(Jefferson, EMBO J, 6, 3901-3907, 1987)に由来しGUS遺伝子をアンチセンスWx cDNAと置換した。以下その方法を説明する。

【0045】pB1221のターミネーターの後ろにあるEcoRI部位を潰すために、このプラスミド1μgをEcoRI(TOYOBO処方の条件10μl 37℃1時間)、エタノール沈殿、klenowフラグメント(TOYOBO処方の条件20μl 37℃30分)の順に処理しその0.1μgをTAKARAライゲーションキットで自己環化し得られたトランスフォーマントの中からEcoRI部位を失ったものを選択する。

【0046】このプラスミド1μgをSacI処理(10u TOYOBOの条件20μl 37℃1時間)の後、塩濃度を100mMに上げて10uのBamHIを加えさらに1時間反応させる。エタノール沈殿後Klenowフラグメント(TOYOBOの処方20μl 37℃30分)で末端を平滑化しEcoRIリンカー(TOYOBO 1μg)と共に環化する(TAKARAライゲーションキット)。トランスフォーマントの中から1.8kb(GUS遺伝子)を失いEcoRI部位を持つ物を選ぶ。

【0047】このプラスミド1μgをEcoRI(10μl反応系)で切断しアルカリフォスファターゼ(1u TOYOBO EcoRI反応液に1M Tris 8.31μlと水40μlを加え65℃30分)処理する。フェノール、クロロホルム、エタノールで精製し

その0.1μgと実施例2で述べたWx cDNA 2.7kb 0.1μgとをライゲーションし35Sプロモーターに対して逆向きに挿入された物を選ぶ(p35 antiCW)。以下このプラスミドを用いて、実施例1、2と同様に、形質転換、カルスの選抜、再生および発現の確認を行い、実施例1、2と同様の結果を得た。

【0048】(実施例4)

アンチセンスWx cDNAのうるち米への導入ベクター(pWantiCW)の構築(図4参照) このベクターはイネWxプロモーターの下流にイネWx遺伝子のアンチセンスcDNA, NOSターミネーターが連結されており、ゲノムに存在するWx遺伝子と時期を同じくしてアンチセンスcDNAを発現させることを意図して構築したものである。

【0049】まず、Wxプロモーターについて説明する。Wx遺伝子全域をカバーするHind III 15kb断片(Okagaki Genetics, 120, 1137-1143, 1988の図4)を制限酵素を用いて分析すると転写領域をもつEcoRI 6kb断片の5'側に隣接してEcoRI 3kb断片があることがわかる。この断片にWx遺伝子のプロモーターがあることは容易に推定できるが、我々の実験によれば、この断片をGUSレポーター遺伝子、NOSターミネーターと連結したプラスミド(Jefferson, EMBO J, 6, 3901-3907, 1987; pB1221の35SプロモーターをWxプロモーターと置換することで得られる)は、イネプロトプラストを用いたトランジェントアッセイにおいてプロモーターとして機能することを確認している。そこでこのEcoRI断片をプロモーターとして用いることとした。この断片はHind III 15kb断片を持つpUCプラスミドEcoRIで切断すれば3kbのバンドとして得られる。

【0050】NOSターミネーターは、pCaMVneo(Fromm, Nature, 319, 719-793, 1986)10μgをPstIとHind IIIで切断し(TOYOBOの処方20μl 37℃1時間)アガロースゲルで分画して0.27kbのバンドとして得ることができるのでこれをプラスミドpUC19のPstI-Hind III部位に挿入した。

【0051】NOSターミネーターの5'上流にあるEcoRI部位に前述のEcoRI 3kb断片を順方向に挿入しWxプロモーターとNOSターミネーターとを連結した。このプラスミドにはEcoRI部位が2か所あるので、このプラスミド10μgを100μlの系でEcoRI 10uを加えて1、2、5、10分反応させEcoRIによる部分分解物を得、エタノール沈殿の後Klenowフラグメント(TOYOBOの処方)で修復して自己環化させ、トランスフォーマントの中から、Wx-NOSの間にだけEcoRI部位を残したプラスミドを得た(pWantiCW')。

【0052】このプラスミドをEcoRIで線状化し、実施例2で述べたWx cDNA (EcoRI 2.7 kb断片)を逆向きに挿入してpWantiCWを得た。以下このプラスミドを用いて、実施例1～3と同様の実験を行い、同様の結果を得た。

【0053】(実施例5)

Wx遺伝子のセンスDNAのもち米への導入ベクター(pWsenseCW)の構築(図4参照)このベクターはWx蛋白を発現しているうるち米あるいは発現していないもち米に、品種名ラベルのWx蛋白を作らせるための構造をしており、Wxプロモーターの下流にWxセンスcDNA、NOSターミネーターを持つ。このプラスミドの構築は実施例4に従うが、プラスミド(pWantiCW')にWx cDNA 2.7 kbを順方向に連結することで得られる。

【0054】<形質転換とセンスWx cDNAの導入されたカルスの選抜、再生>糯米(祝稲、むさしもち)の完熟種子由来カルスより作製したサスペンションからプロトプラストを調製し、実施例4のプラスミドpWantiGWのかわりにpWsenseCWを用いて実施例1同様に遺伝子を導入し、ハイグロマイシン耐性カルスを得た。カルスから単離したゲノミックDNAについて実施例2と同じプライマーを用いてPCRを行い導入遺伝子の確認を行った。また、再生葉からゲノミックDNAを単離し実施例2と同様EcoRIで切断しWx遺伝子のcDNAを用いたサザン解析で確認した。

【0055】<花粉および完熟種子におけるセンスWx cDNAの発現の確認>実施例1のように花粉、種子を染色し、もち型イネにセンスWx遺伝子を導入した植物の種子ではもち型以外にうるち型(あるいは超うるち

型)を示す種子が観察された。

【0056】

【発明の効果】本発明においては、Wx遺伝子のセンスDNAあるいはアンチセンスDNAを植物体に導入することにより、所望のアミロース含量を有するイネを作出することが可能である。

【0057】

【配列表】配列番号:1

配列の長さ:2286

配列の型:核酸

鎖の数:2本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ゲノミックDNA

起源

生物名:イネ(Oryza sativa)

株名:Labelle

配列の特徴

特徴を表わす記号:CDS

存在位置:1265..1603

特徴を決定した方法:S

特徴を表わす記号:CDS

存在位置:1717..1797

特徴を決定した方法:S

特徴を表わす記号:CDS

存在位置:1905..2003

特徴を決定した方法:S

特徴を表わす記号:CDS

存在位置:2100..2189

特徴を決定した方法:S

配列

```
CTGCAGTCTC TCTCTCTCTC TCTCTCTCTC TCTCTCTCTC TCTCTCTCTG CTTCACCTTCT 60
CTGCTTGTGT TGTCTGTGTG TTCATCAGGA AGAACATCTG CAAGGTATAC ATATATGTTT 120
ATAATTCCTT GTTCCCTC TTATTCAGAT CGATCACATG CATCTTTCAT TGCTCGTTTT 180
TCCTTACAAG TAGTCTCATA CATGCTAATT TCTGTAAGGT GTTGGGCTGG AAATTAATTA 240
ATTAATTAAT TGAATGCCA AGATCCATAT ATATGCTCTG ATATTAATC TTCGTTCTGT 300
ATGTTTGGTT AGGCTGATCA ATGTTATTCT AGAGTCTAGA GAAACACACC CAGGGGTTTT 360
CCAACTAGCT CCACAAGATG GTGGGCTAGC TGACCTAGAT TTGAAGTCTC ACTOCTTATA 420
ATTATTTTAT ATTAGATCAT TTTCTAATAT TCGTGTCTTT TTTTATTCTA GAGTCTAGAT 480
CTTGTTGTTCA ACTCTCGTTA AATCATGTCT CTCGCCACTG GAGAAACAGA TCAGGAGGGT 540
TTATTTTGGG TATAGGTCAA AGCTAAGATT GAAATTCACA AATAGTAAAA TCAGAATCCA 600
ACCAATTTTA GTAGCCGAGT TGGTCAAAGG AAAATGTATA TAGCTAGATT TATTGTTTTG 660
GCAAAAAAAA ATCTGAATAT GCAAAATACT TGTATATCTT TGTATTAAGA AGATGAAAAT 720
AAGTAGCAGA AAATTAAGAA ATGGATTATA TTTCTCTGGC TAAAGAAATT GTTGATTGG 780
CACAAATTA TTAATCAAT CATCTGATCT GCTCAAAGCT CTGTGCATCT CCGGGTGCAA 900
CGGCCAGGAT ATTTATTGTG CAGTAAAAAA ATGTCATATC CCCTAGCCAC CCAAGAAACT 960
GCTCCTTAAG TCCTTATAAG CACATATGGC ATTGTAATAT ATATGTTTGA GTTTTAGCGA 1020
CAATTTTTTT AAAAATTTTT GGTCTTTTTT ATGAACGTTT TAAGTTTCAC TGTCTTTTTT 1080
TTTCAATTT TAAATGTAGC TTCAAATTCT AATCCCAAT CCAAATTGTA ATAACTTCA 1140
```

ATTCTCCTAA TTAACATCTT AATTCATTTA TTTGAAAACC AGTTCAAATT CTTTtaggCT 1200
 CACCAAACCT TAAACAATTC AATTCAGTGC AGAGATCTTC CACAGCAACA GCTAGACAAC 1260
 CACC ATG TCG GCT CTC ACC ACG TCC CAG CTC GCC ACC TCG GCC ACC GGC 1309
 Met Ser Ala Leu Thr Thr Ser Gln Leu Ala Thr Ser Ala Thr Gly
 1265 1270 1275
 TTC GGC ATC GCC GAC AGG TCG GCG CCG TCG TCG CTG CTC CGC CAC GGG 1357
 Phe Gly Ile Ala Asp Arg Ser Ala Pro Ser Ser Leu Leu Arg His Gly
 1280 1285 1290 1295
 TTC CAG GGC CTC AAG CCC CGC AGC CCC GCC GGC GGC GAC GCG ACG TCG 1405
 Phe Gln Gly Leu Lys Pro Arg Ser Pro Ala Gly Gly Asp Ala Thr Ser
 1300 1305 1310
 CTC AGC GTG ACG ACC AGC GCG CGC GCG ACG CCC AAG CAG CAG CGG TCG 1453
 Leu Ser Val Thr Thr Ser Ala Arg Ala Thr Pro Lys Gln Gln Arg Ser
 1315 1320 1325
 GTG CAG CGT GGC AGC CGG AGG TTC CCC TCC GTC GTC GTG TAC GCC ACC 1501
 Val Gln Arg Gly Ser Arg Arg Phe Pro Ser Val Val Val Tyr Ala Thr
 1330 1335 1340
 GGC GCC GGC ATG AAC GTC GTG TTC GTC GGC GCC GAG ATG GCC CCC TGG 1549
 Gly Ala Gly Met Asn Val Val Phe Val Gly Ala Glu Met Ala Pro Trp
 1345 1350 1355
 AGC AAG ACC GGC GGC CTC GGT GAC GTC CTC GGT GGC CTC CCC CCT GCC 1597
 Ser Lys Thr Gly Gly Leu Gly Asp Val Leu Gly Gly Leu Pro Pro Ala
 1360 1365 1370 1375
 ATG GCT GTAAGCA CACACAACT TCGATCGCTC GTCGTCGCTG ACCGTCGTCG 1650
 Met Ala
 TCTTCAACTG TTCTTGATCA TCGCATTGGA TGGATGTGTA ATGTTGTGTT CTTGTGTTCT 1710
 TTGCAG CCG AAT GGC CAC AGG GTC ATG GTG ATC TCT CCT CGG TAC GAC 1758
 Ala Asn Gly His Arg Val Met Val Ile Ser Pro Arg Tyr Asp
 1380 1385 1390
 CAG TAC AAG GAC GCT TGG GAT ACC AGC GTT GTG GCT GAG GTA 1800
 Gln Tyr Lys Asp Ala Trp Asp Thr Ser Val Val Ala Glu
 1395 1400
 GGAGCATATG CGTGATCAGA TCATCACAAG ATCGATTAGC TTTAGATGAT TTGTTACATT 1860
 TCGCAAGATT TTAACCCAAG TTTTGTGGT GCAATTCATT GCAG ATC AAG GTT GCA 1916
 Ile Lys Val Ala
 1405
 GAC AGG TAC GAG AGG GTG AGG TTT TTC CAT TGC TAC AAG CGT GGA GTC 1964
 Asp Arg Tyr Glu Arg Val Arg Phe Phe His Cys Tyr Lys Arg Gly Val
 1410 1415 1420
 GAC CGT GTG TTC ATC GAC CAT CCG TCA TTC CTG GAG AAG GTGGAGT 2010
 Asp Arg Val Phe Ile Asp His Pro Ser Phe Leu Glu Lys
 1425 1430 1435
 CATCATTAGT TTACCTTTTT TGTCTTTACT GAATTATTAA CAGTGCAATT AGCAGTTGGA 2070
 CTGAGCTTAG CTTCCTCTGG TGATTTCAG GTT TGG GGA AAG ACC GGT GAG AAG 2123
 Val Trp Gly Lys Thr Gly Glu Lys
 1440 1445
 ATC TAC GGA CCT GAC ACT GGA GTT GAT TAC AAA GAC AAC CAG ATG CGT 2171
 Ile Tyr Gly Pro Asp Thr Gly Val Asp Tyr Lys Asp Asn Gln Met Arg
 1450 1455 1460
 TTC AGC CTT CTT TGC CAG G TCAGTGATTA CTTCTATCTG ATGATGGTTG 2220

Phe Ser Leu Leu Cys Gln

1465

GAAGCATCAC GAGTTTACCA TAGTATGTAT GATTCATAAC TAATTCGTGT ATTGATCTAC 2280

CTGCAG

2286

【図面の簡単な説明】

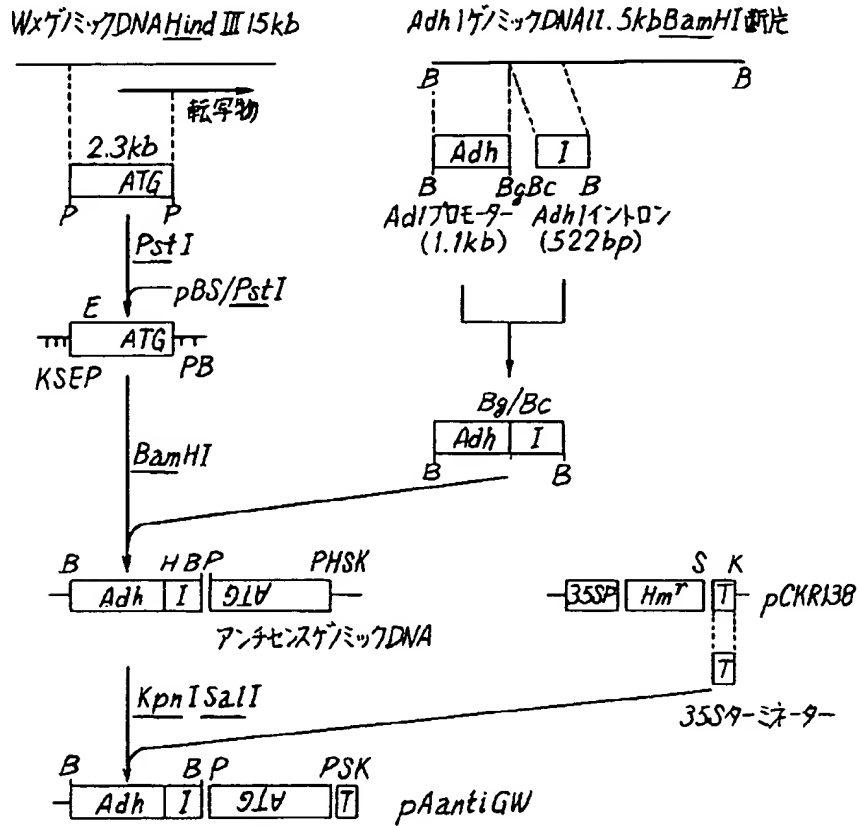
【図1】 本発明の発現ベクターpAantiGWの構築概念を表わす図面である。

【図2】 本発明の発現ベクターpAantiCWの構築概念を表わす図面である。

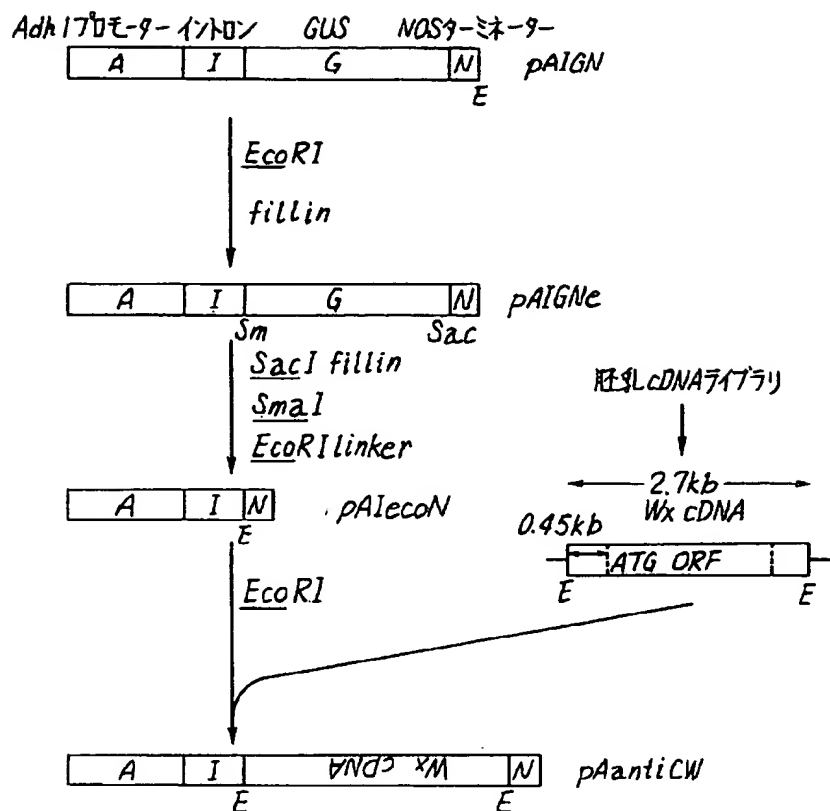
【図3】 本発明の発現ベクターp35antiCWの構築概念を表わす図面である。

【図4】 本発明の発現ベクターpWantiCWの構築概念を表わす図面である。

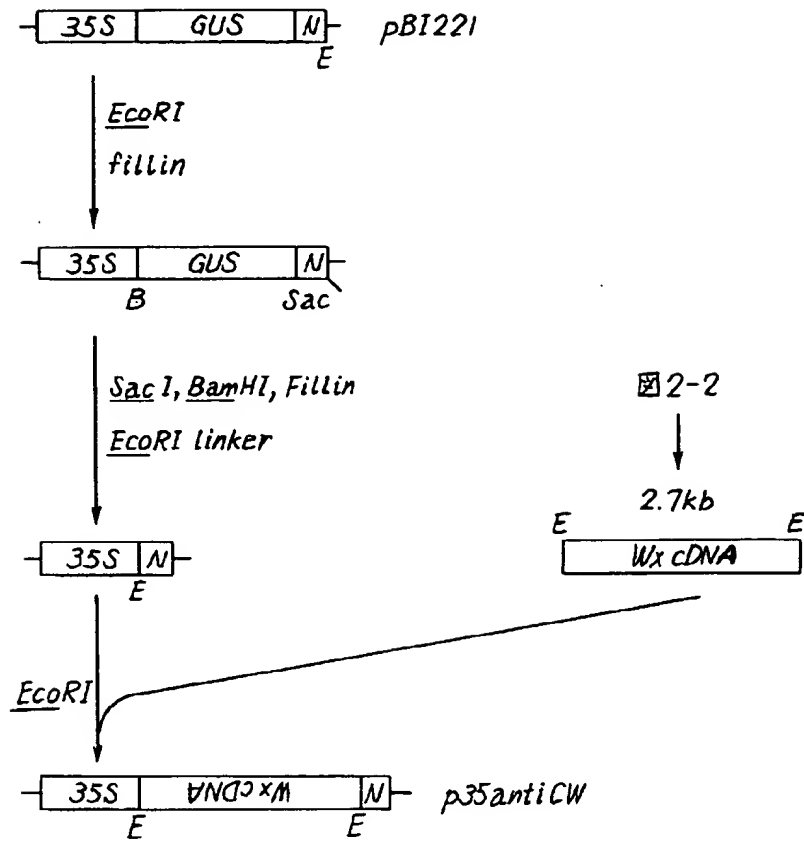
【図1】



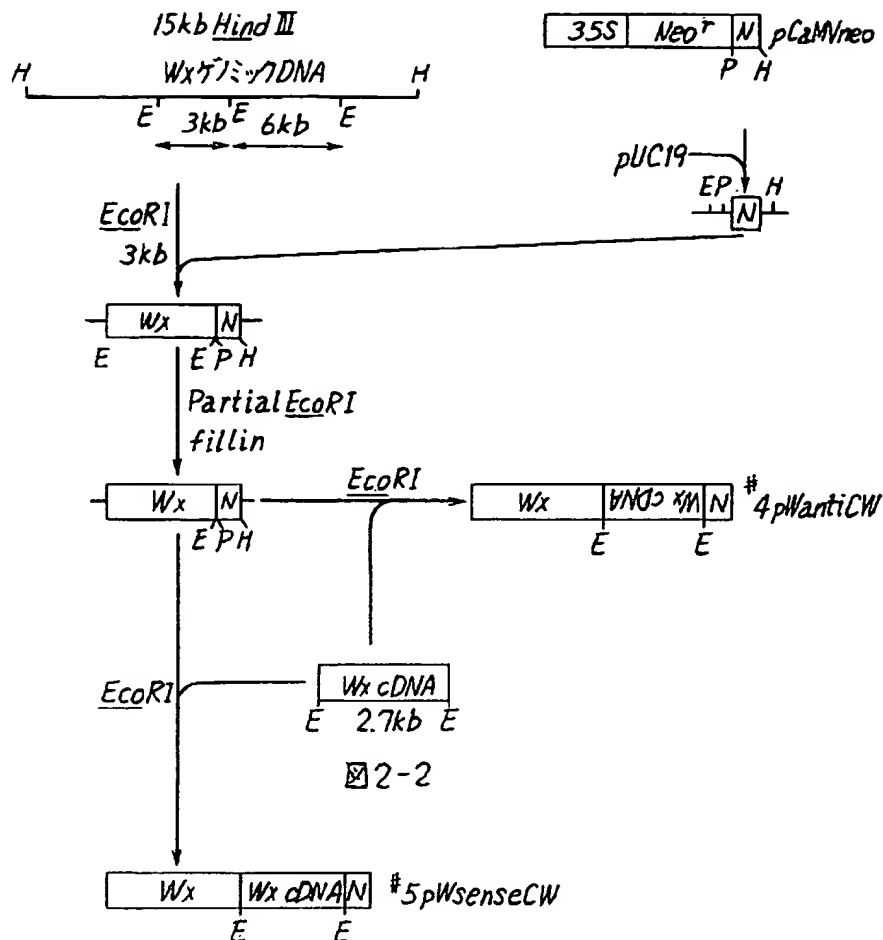
【図2】



【図3】



【図4】



【手続補正書】

【提出日】平成4年10月16日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0038

【補正方法】変更

【補正内容】

【0038】III. 花粉および完熟種子におけるアンチセンス*Wx* ゲノミックDNAの発現の確認
花粉、あるいは完熟種子胚乳部分の切片（1mm幅）を、ヨード液中におき浸透させた。5分後、粳型イネ（アミロース含量15～25%）の花粉では黒褐色、糯型イネ（アミロペクチン100%）の花粉では茶褐色を呈し、アンチセンス*Wx* 遺伝子の導入されたイネの花粉は、粳型、糯型、両者の中間型が混在することが観察された。完熟種子胚乳切片においても、粳米では黒紫色、糯米では白色を呈するのに対し、アンチセンス*Wx* 遺伝

子の導入された種子では、粳米以外に中間型を呈するものが観察された。

IV. 後代の植物体におけるアンチセンス*Wx* ゲノミックDNAの発現の確認

上記II. で再生した植物体（ R_0 世代）に形成された種子（ R_1 世代）を播種し、これより形成された種子（ R_2 世代）の胚乳のアミロース含量を上記III. と同様にしてヨウ素呈色比色法で測定したところ、5.5～19%であった（粳米品種の日本晴は20%）。

【表1】

世代	R ₁	R ₂	アミロース含量 (%)
N01	1		15
	2		16
	3		16
	4		16
	5		16.5
	6		16.5
	7		16.5
	8		16.5
	9		17
	10		17
	11		17.5
	12		17.5
	13		18
	14		18
	15		18.5
N02	1		5.5
	2		10
	3		14
	4		15
	5		19

以上の結果から、ゲノミックアンチセンスWx遺伝子を
粳米品種に導入することによりアミロース含量を低下さ
せることができ、かかる形質は後代まで遺伝されることが
確認された。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0047

【補正方法】変更

【補正内容】

【0047】このプラスミド1μgをEcoRI(10
μl反応系)で切断しアルカリフォスファターゼ(1u
TOYOBO EcoRI反応液に1M Tris
8.31μlと水40μlを加え65℃ 30分)処理
する。フェノール、クロロホルム、エタノールで精製し
その0.1μgと実施例2で述べたWx cDNA2.
7kb 0.1μgとをライゲーションし35Sプロモ
ーターに対して逆向きに挿入された物を選ぶ(p35a
ntiCW)。以下このプラスミドを用いて、実施例
1、2と同様に、形質転換、カルスの選抜、再生および
発現の確認を行い、実施例1、2と同様の結果を得た。
また再生した植物体(R₀世代)の中からアンチセンス
Wx遺伝子が導入されたものをサザン法で選抜し、その
種子(R₁世代)の胚乳におけるアミロース含量を測定
したところ、10～30%程度であった。

【表2】

世代	R ₀	R ₁	アミロース含量 (%)
N01	1		10
	2		11
		1	14
		2	15
		3	15
		4	16
		5	18
		6	18
		7	20
		8	22
		9	22
		10	24
		11	26
		12	26
		13	28
		14	28
		15	29
		16	30

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0052

【補正方法】変更

【補正内容】

【0052】このプラスミドをEcoRIで線状化し、
実施例2で述べたWx cDNA(EcoRI 2.7
kb断片)を逆向きに挿入してpWantiCWを得
た。以下このプラスミドを用いて、実施例1～3と同様
に、形質転換、カルスの選抜、再生および発現の確認を
行い、同様の結果を得た。また再生した植物体(R₀世
代)の中からアンチセンスWx遺伝子が導入されたもの
をサザン法で選抜し、その種子(R₁世代)の胚乳を調
べたところ、アミロース含量およびWx蛋白量ともに減
少した個体の存在が確認された。R₁世代におけるアミ
ロース含量の分布は、0.5～17%程度であった(図
5)。さらにアミロース含量の低下した種子(R₁世
代)を播種し、これに形成された未熟胚乳のRNAをノ
ザン解析したところ、WxのmRNAの減少が認められ
た。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0055

【補正方法】変更

【補正内容】

【0055】<花粉および完熟種子におけるセンスWx
cDNAの発現の確認>実施例1のように花粉、種子

を染色し、もち型イネにセンスWx遺伝子を導入した植物の種子ではもち型以外にうるち型（あるいは超うるち型）を示す種子が観察された。

<後代の種子におけるWx mRNAの確認>再生した植物体（R₀世代）の中からセンスWx遺伝子が導入されたものをサザン法で選抜し、その未熟種子（R₁世代）のRNAを調べたところ、品種ラベルに匹敵するmRNAを産生している個体が確認された。また完熟種子のアミロース含量とWx蛋白量との関係は、図6に示すように品種ラベルと同等の高レベルであり、日本の栽培品種より上回っていた。R₁世代のアミロース含量分布は、19～35%程度であった（糯品種は0%、日本の粳品種日本晴は20%、アメリカの粳品種ラベルは28%）。以上の結果から、センスWx遺伝子を糯品種に導入することによりアミロース含量を増加させることができ、かかる形質は後代まで遺伝されることが確認された。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

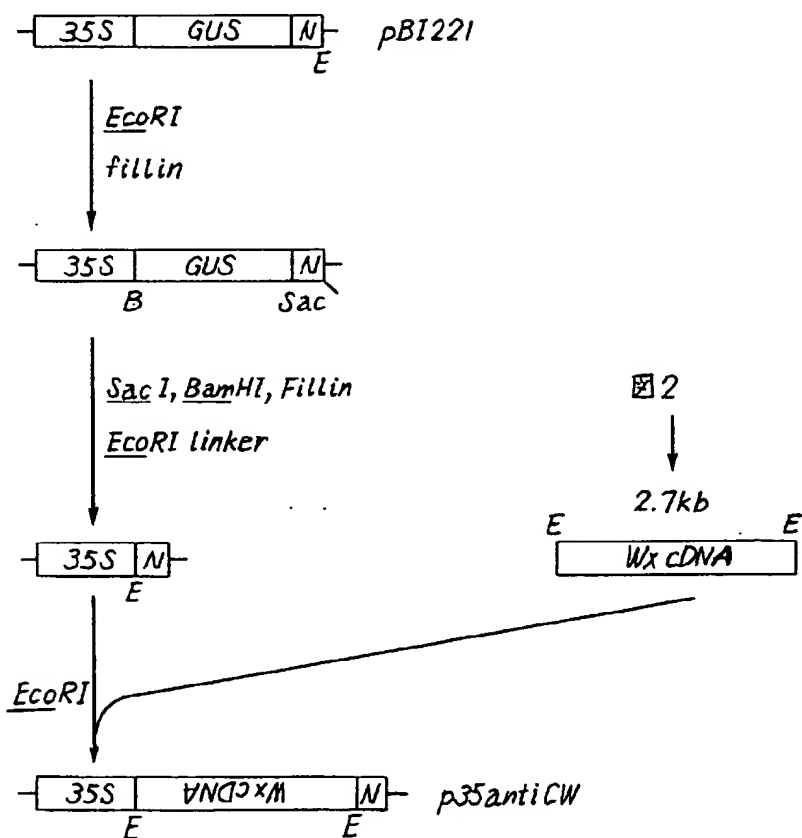
【補正対象項目名】図面の簡単な説明

【補正方法】変更

【補正内容】

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の発現ベクターpAantiGWの構築



【手続補正7】

概念を表わす図面である。

【図2】本発明の発現ベクターpAantiCWの構築概念を表わす図面である。

【図3】本発明の発現ベクターp35antiCWの構築概念を表わす図面である。

【図4】本発明の発現ベクターpWantiCWおよびpWsenseCWの構築概念を表わす図面である。

【図5】アンチセンスベクターpWantiCWを導入した形質転換体の胚乳（R₁世代）のアミロース含量とWx蛋白量との関係を表わした図面である。図中、★はコントロール（日本晴）を、■は形質転換体1を、●は形質転換体2を示す。

【図6】センスベクターpWsenseCWを導入した形質転換体の胚乳（R₁世代）のアミロース含量とWx蛋白量との関係を表わした図面である。図中、★はコントロール（日本晴）を、●はコントロール（祝稲）を、○は形質転換体を示す。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図3

【補正方法】変更

【補正内容】

【図3】

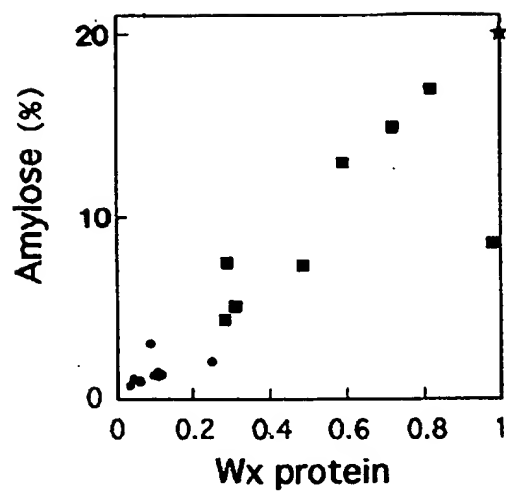
【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図 5

【補正方法】追加

【補正内容】

【図 5】



【手続補正 8】

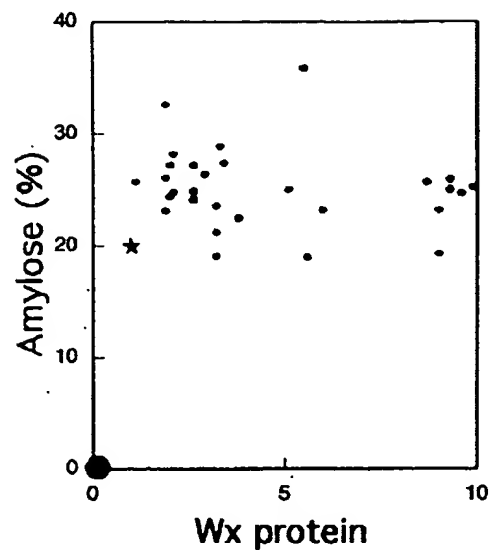
【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図 6

【補正方法】追加

【補正内容】

【図 6】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁵

C 1 2 N 5/10

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

(72) 発明者 伊藤 紀美子

神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 株
式会社植物工学研究所内

(72) 発明者 島本 功

神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 株
式会社植物工学研究所内

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.